



DCM040-11
Ed. 09/2018

CH50

per analisi di routine

- TEST DI FUNZIONALITÀ DEL COMPLEMENTO (CH 50) -

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO040

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione qualitativa della funzionalità del complemento nel siero umano.

Il kit CH50 è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

La riduzione del CH50 avviene quando i diversi componenti del complemento sono carenti o consumati.

L'impiego principale di questo test riguarda il campo dell'allergologia - immunologia per individuare la carenza dei componenti del complemento associata all'immunodeficienza (carenza dei componenti del complemento soprattutto classico o terminale). Diversi componenti assenti o significativamente ridotti del complemento possono provocare infezioni, meningite di Neisserial, o setticemia.

Un CH50 ridotto induce l'approfondimento delle analisi funzionali di diversi componenti del complemento.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il complesso precipitato β -galattosidasi/anti- β -galattosidasi viene solubilizzato dal siero mediante deposizione di molecole di C3b. La formazione della quantità di C3b per la solubilizzazione è mediata dalla via alternativa, ma è accelerata dall'attività della C3-convertasi della via classica.

La quantità di complesso β -galattosidasi/Anti- β -galattosidasi dissociata dall'anticorpo, rilevabile tramite attività enzimatica nel supernatante al termine della reazione, è una misura della capacità del siero di formare C3b.

Come substrato enzimatico viene usato o-nitrofenilgalattopiranoside (o-NPG) e la misura del prodotto (o-nitrofenolo) effettuata a 420 nm (405 nm).

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Reference Calibrator (1 flacone, 0,6 mL)
REF DCE030/4030-0
2. Incubation Buffer (1 flacone, 12 mL)
Phosphate buffer 50 mM pH 7,35
REF DCE024-0
3. Immunocomplex (2 flaconi, 3 mL ciascuno)
 β -galattosidasi/anti- β -galattosidasi
REF DCE025-0
4. Microplate (1 micropiastra breakable)
Micropiastra vuota
REF DMZ003
5. ONPG Substrate (1 flacone, liofilizzato)
Phosphate buffer 15 mM pH 7,0, o-NPG 2,3 mM
(evitare il contatto con la pelle)
REF DCE026-0
6. Etandiolo (1 flacone, 1 mL)
(Nocivo per ingestione)
REF DCE027-0
7. Stop Solution (1 flacone, 7 mL)
Tris buffer
REF DCE028-0
8. Controlli con diversi livelli di solubilizzazione
(2 flaconi, 0,6 mL ciascuno)
Low Control
REF DCE045/4001-0
High Control
REF DCE045/4002-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettoce per micropiastre (filtro a 420 nm o 405 nm).

Incubatore 37°C

Centrifuga (10000 - 13500 xg "RCF")

Note

Il Reference Calibrator e i Controlli sono sintetici; infatti garantiscono una più alta riproducibilità e una maggiore stabilità rispetto a quelli di origine umana. Tutti i reagenti devono essere conservati a 2-8°C al buio e usati entro la data scritta sulla confezione esterna. Portare i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) prima dell'uso.

Rispettare la stessa sequenza nella distribuzione dei reattivi.

Usare solo campioni serici (evitare l'uso di campioni plasmatici). I campioni umani sono stabili un mese se conservati a -20°C (sei mesi se conservati a -80°C).

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani, e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE; comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN_3) come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- L'ONPG Substrate contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- L'Etandiolo è nocivo per ingestione; in caso di ingestione consultare immediatamente un medico.
- Evitare l'esposizione del reagente ONPG Substrate a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.

- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta dell'ONPG Substrate dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta dell'ONPG Substrate e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dell'Immunocomplesso

Usare il reattivo senza diluire.

Prima dell'uso agitare accuratamente l'immunocomplesso precipitato mediante vortex.

Stabile 3 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione dell'ONPG Substrate

Aggiungere 10 mL di acqua distillata. A dissoluzione avvenuta aggiungere 0,5 mL di Etandiolo. Stabile 2 mesi a 2-8°C.

Importante: per una migliore ripetibilità (inter-assay), si consiglia di portare il substrato a temperatura ambiente (22-28°C) prima dell'uso (evitare la dispensazione del reagente appena tolto dal frigo).

6.3. Procedimento

Step 1 in tubi Eppendorf

Dispensare i campioni serici, il Controllo non solubilizzante ed il Reference Calibrator in una provetta eppendorf:

	Reference Calibrator	Campione o Controlli	Controllo non solubilizzante
Incubation Buffer	100 µL	100 µL	150 µL
Reference calibrator	50 µL	/	/
Campione o Controlli	/	50 µL	/
Immunocomplex	50 µL	50 µL	50 µL

Vortexare ed invertire la provetta varie volte assicurandosi che la soluzione sia miscelata bene. Incubare 2 ore a 37°C
Centrifugare a 10000-13500 xg "RCF" per 15 minuti.
Trasferire con cura, evitando di toccare il pellet, 50µL del sovrantante di ciascuna eppendorf nel pozzetto della micropiastra

Importante:

- evitare la risospensione del pellet (NB: spesso il pellet è poco visibile, ma è presente sul fondo della provetta; evitare quindi di toccare il fondo della provetta con il puntale).
- non agitare il centrifugato
- prendere il sovrantante delicatamente per evitare turbolenze che potrebbero causare la risospensione del pellet

(il pellet è composto da immuno-complesso non solubilizzato con alta attività enzimatica (β-Galattosidasi); la presenza di una piccola quantità di pellet nel sovrantante può causare falsi positivi e valori alterati dei controlli).

Step 2 nella Micropiastra

	Bianco	Reference Calibrator	Campione o Controlli	Controllo non solubilizzante
Incubation Buffer	50 µL	/	/	/
Sovrantante	/	50 µL	50 µL	50 µL
ONPG-Substrate	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

Incubare 15 minuti a 37°C al riparo dalla luce.

Stop solution	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
---------------	-------	-------	-------	-------

Agitare delicatamente la micropiastra.
Leggere l'assorbanza contro il bianco a 420 (o 405) nm.

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di CH50 per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati sperimentali o nella degradazione dei reagenti del kit. Reagenti

freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

8.1. Interpretazione dei risultati

Il risultato espresso dal kit Diametra CH50 non è un risultato diagnostico in se stesso.

Questo risultato dovrebbe essere interpretato in congiunzione con altri test così come va valutato il quadro clinico del paziente.

Il kit Diametra CH50 fornisce una valutazione dell'attività funzionale del Complemento Totale. Questo test può determinare livelli anormali di complemento ma non identificare il o i componenti anormali.

Il metodo tradizionale per la determinazione dell'attività funzionale del complemento è il metodo dell'emolisi totale. Questo metodo Diametra CH 50 sfrutta la capacità del complemento di solubilizzare gli immunocomplessi ed è assolutamente correlabile con gli altri metodi commerciali.

Con questa reazione viene misurata l'attivazione dei componenti del complemento sia della via classica che di quella terminale. L'attività totale del complemento è di solito anormale se un qualsiasi componente è deficitario. La valutazione del CH50 è utile per lo screening genetico per le carenze del sistema del complemento e nel monitoraggio della progressione della patologia in pazienti con malattie degli immunocomplessi.

9. RISULTATI

9.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun dei controlli, del reference calibrator e di ogni campione.

9.2. Calcolo dei risultati

I risultati possono essere espressi come:

- Valore CH50
- % del Reference Calibrator

Il valore (CH50) del Reference Calibrator varia in base al Lotto; l'esatto valore è riportato sull'etichetta.

Determinate i risultati usando la seguente formula:

- $OD(\text{campione}) / OD(\text{Reference Calibrator}) \times CH50(\text{valore del Reference Calibrator}) = \text{Valore CH50 del campione}$
- $OD(\text{campione}) / OD(\text{Reference Calibrator}) \times CH(\% \text{ del Reference Calibrator}) = \% \text{ del Reference Calibrator}$

Esempio:

Valore CH50 del flacone Reference Calibrator = 100

% CH50 del flacone Reference Calibrator = 50

Assorbanza del Reference Calibrator = 0.350

Assorbanza del Campione = 1.108

a. Valore del CH50 del Campione = $1.108/0.350 \times 100 = 316$

b. % di Riferimento del Campione = $1.108/0.350 \times 50 = 158\%$

10. VALORI DI RIFERIMENTO

% Riferimento	Valore CH50	Interpretazione
0 – 50	0 – 100	Assente o bassa
51 – 150	101 – 300	Normale
> 151	> 301	Alto

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione “normale” è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un’indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

11. PARAMETRI CARATTERISTICI

11.1. Correlazione

Sono stati testati 22 campioni provenienti da donatori sani, con il kit CH50 Diametra ed un analogo kit disponibile in commercio. I risultati sono stati elaborati mediante analisi delle curve ROC su due livelli (basso e normale) da cui risulta:

Sensibilità	100,0%
Specificità	94,4%
Accordo globale	95,5%

12. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

- Miller G.W , Nussenzweig V., PNAS, 72, 418 – 1975.
- Takahaschi M., Takahaschi S., Brade U., Nussenzweig V. J. Clin. Invest. 62, 349 – 1978.
- Migliorini P, et al. J. of Immunological Methods, 77 119-130 (1985)

Ed. 09/2018

DCM040-11

DiaMetra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM040-11
Ed. 09/2018

CH50

for routine analysis

- FUNCTIONALITY TEST OF COMPLEMENT (CH 50) -

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO040

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of complement functionality in human serum.

CH50 kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

The primary utility of the CH50 in the practice of an allergist-immunologist is to screen for complement-deficiency associated immunodeficiency (primarily classic or terminal complement component deficiencies). Absent or significantly reduced individual complement components may result in infections, Neisserial meningitis, or sepsis.

A reduced CH50 in this situation warrants quantification and functional assays of individual complement components.

Reduction of the CH50 occurs when individual complement component(s) are deficient or consumed.

2. PRINCIPLE

The complex β -galactosidase/anti- β -galactosidase, is solubilized by serum through the deposition of C3b molecules. The formation of C3b quantity necessary for the solubilization is mediated by alternative pathway, but it is accelerated from activity of C3-convertase by classic way.

The quantity of complex β -galactosidase/Anti β -galactosidase dissociated from the antibody, detectable by enzymatic activity in the supernatant at the end of the reaction, is a measure of serum capacity to form C3b molecules.

The o-nitrophenilgalactopiranoside (o-NPG) is used as substrate and the measure of reagent product (o-nitrophenol) is read at 420nm (or 405 nm).

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Reference Calibrator (1 vial, 0.6 mL)
REF DCE030/4030-0
2. Incubation Buffer (1 vial, 12 mL)
Phosphate buffer 50 mM pH 7.35
REF DCE024-0
3. Immunocomplex (2 vials, 3 mL each)
 β -galactosidase/anti- β -galactosidase
REF DCE025-0
4. Microplate (1 breakable microplate)
Empty microplate
REF DMZ003
5. ONPG Substrate (1 vial, lyophilized)
Phosphate buffer 15 mM pH 7.0 o-NPG 2.3 mM
(avoid any skin contact)
REF DCE026-0
6. Ethanol (1 vial, 1 mL)
(Harmful if swallowed)
REF DCE027-0
7. Stop Solution (1 vial, 7 mL)
Tris buffer
REF DCE028-0
8. Controls with different levels of solubilisation
(2 vials, 0.6 mL each)
Low Control
REF DCE045/4001-0
High Control
REF DCE045/4002-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser
Microplates reader (filter at 420 nm or 405 nm)
Incubator 37°C
Centrifuge (10000 - 13500 xg "RCF")

Note

The Reference calibrator and Controls are synthetic; they guarantee higher reproducibility and stability compared with the reference of human origin.

Store all reagents at 2-8°C in the dark and use them before the expiry date of the kit. Bring all reagents to room temperature (22-28°C) before using.

Maintain the same order in reagents dispensation.

Use only serum sample (avoid to use plasma samples). Human serum are stable one month at -20°C (six months if stored at -80°C).

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy, and the bovine proteins have been obtained from countries not infected by BSE; however these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The ONPG Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- Ethanediol is harmful if swallowed; in case of ingestion consult a physician immediately
- Avoid the exposure of reagent ONPG Substrate to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate

- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Immunocomplex

Use the reagent without any dilution. Before using mix well the immunocomplex with vortex. Stable 3 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of the ONPG-Substrate

Add 10 mL of distilled water to the reagent. Once the reagent is dissolved, add 0.5 mL of Ethanediol. Stable for 2 months at 2-8°C.

Important: for a better repeatability (inter-assay), we suggest to bring the substrate at room temperature (22-28°C) before using (avoid the dispersion of reagent just removed from the fridge).

6.3. Procedure

Step 1 in Eppendorf tubes

Dispense each serum sample, the reference calibrator and a not solubilising control in a eppendorf tube:

	Reference Calibrator	Sample or Controls	Not solubilizing control
Incubation Buffer	100 µL	100 µL	150 µL
Reference calibrator	50 µL	/	/
Sample or Controls	/	50 µL	/
Immunocomplex	50 µL	50 µL	50 µL

Vortex and invert few times the tube to be sure that the solution is well mixed. Incubate 2 hours at 37°C

Centrifuge at 10000-13500 xg "RCF" for 15 minutes.

Transfer with care, avoid touching the pellet with the pipette, 50µL of supernatant of each eppendorf tube in the well of microplate.

Important:

- avoid the suspension of the pellets (NB: the pellet is often not very visible, but it is at the bottom of the tube; thus, avoid to touch the bottom of the tube with the tip).
- do not shake the centrifugate
- take slowly the supernatant in order to avoid turbulences that cause the suspension of pellet

(the pellet is composed of not solubilised immunocomplex with high enzymatic activity (β-Galactosidase); the presence of a small quantity of pellet in the supernatant can cause false positives and erroneous values for controls).

Step 2 in the Microplate

	Blank	Reference Calibrator	Sample or Controls	Not solubiliz. control
Incubation Buffer	50 µL	/	/	/
Supernatant	/	50 µL	50 µL	50 µL
ONPG-Substrate	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 15 minutes at 37°C in the dark.				
Stop solution	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (O.D.) at 420 nm (or 405) against Blank.				

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of CH50 for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. LIMITATIONS OF PROCEDURE

8.1. Interpretation of results

Diametra CH50 results are not diagnostic themselves. Test results should be interpreted in conjunction with other laboratory tests as well as the clinical presentation of the patient.

The Diametra CH50 kit will provide an assessment of the functional activity of total complement. This test can determine abnormal complement levels but cannot identify the abnormal component or components. Individual component abnormalities or abnormalities in the alternative pathway can exist despite a normal CH50.

The traditional method for the activity determination of complement is the method total haemolysis. The Diametra CH 50 method is based on the capacity of complement to solubilize the immunocomplex.

Both the classic activation and the terminal complement components are measured in this reaction. Total complement activity is usually abnormal if any component is defective.

Assessment of CH50 is useful in screening for genetic deficiencies in the complement system and in monitoring the progress of patients with immunocomplex disease.

9. RESULTS

9.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbencies (Em) of reference calibrator, controls and of each sample.

9.2. Calculation of Results

The result can be expressed as:

- CH50 value or
- % of Reference Calibrator

The exact CH50 Value of Reference Calibrator is Lot-dependent and is reported on the label.

Determine the results using the following formula:

- $OD(\text{sample}) / OD(\text{Reference Calibrator}) \times CH50(\text{value of Reference Calibrator}) = CH50 \text{ Value of sample}$
- $OD(\text{sample}) / OD(\text{Reference Calibrator}) \times CH50 (\% \text{ of Reference Calibrator}) = \% \text{ of Reference Calibrator}$

Example:

CH50 Value of Reference Calibrator Vial = 100

CH50 % of Reference Calibrator Vial = 50

Absorbance of Reference Calibrator = 0.350

Absorbance of Sample = 1.108

a. CH50 Value of Sample = $1.108/0.350 \times 100 = 316$

b. % of Reference Calibrator = $1.108/0.350 \times 50 = 158\%$

10. REFERENCE VALUES

% Reference	CH50 Value	Interpretation
0 – 50	0 – 100	Absence or low
51 – 150	101 – 300	Normal
> 151	> 301	High

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

11. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

11.1. Correlation

Were tested 22 samples from healthy blood donors, with the Diametra CH50 kit and with a similar commercially available kit. The results were processed by ROC curves analysis on two levels (low and normal) showing:

Sensitivity	100.0%
Specificity	94.4%
Overall agreement	95.5%

12. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Miller G.W , Nussenzweig V., PNAS, 72, 418 – 1975.
- Takahaschi M., Takahaschi S., Brade U., Nussenzweig V. J. Clin. Invest. 62, 349 – 1978.
- Migliorini P, et al. J. of Immunological Methods, 77 119-130 (1985)

Ed. 09/2018

DCM040-11

DiaMetra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

Example Version



DCM040-11
Ed. 09/2018

CH50

para análisis de rutina

ENSAYO DE FUNCIONALIDAD DEL COMPLEMENTO (CH 50)

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO040

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cualitativa de la funcionalidad del complemento en suero humano.

El kit CH50 está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La reducción de CH50 se produce cuando los distintos componentes del complemento son deficientes o están consumidos.

El uso principal de este ensayo se refiere al campo de la alergología - inmunología para detectar la deficiencia de los componentes del complemento asociada a la inmunodeficiencia (deficiencia de los componentes del complemento, especialmente clásico o terminal). La ausencia o la reducción significativa de diversos componentes del complemento puede provocar infecciones, meningitis por *Neisseria meningitidis* o septicemia.

Un CH50 reducido induce a la profundización de los análisis funcionales de distintos componentes del complemento.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El complejo precipitado β-galactosidasa/anti-β-galactosidasa se solubiliza por el suero mediante la deposición de moléculas de C3b. La formación de la cantidad de C3b para la solubilización está mediada por la vía alternativa, pero se acelera por la actividad de la C3-convertasa de la vía clásica.

La cantidad de complejo β-galactosidasa/anti-β-galactosidasa disociada del anticuerpo, detectable en el sobrenadante al final de la reacción a través de la actividad enzimática, es una medición de la capacidad del suero para formar C3b.

Como sustrato enzimático se usa o-nitrofenilgalactopiranosido (o-NPG) y la medición del producto (o-nitrofenol) realizada a 420 nm (405 nm).

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibrador de referencia (1 frasco, 0,6 mL)
REF DCE030/4030-0
2. Tampón de incubación (1 frasco, 12 mL)
Tampón fosfato 50 mM pH 7,35
REF DCE024-0
3. Inmunocomplejo (2 frascos, 3 mL cada uno)
β-galactosidasa/anti-β-galactosidasa
REF DCE025-0
4. Microplaca (1 microplaca rompible)
REF DMZ003
5. Substrato ONPG (1 frasco, liofilizado)
Tampón fosfato 15 mM pH 7,0, o-NPG 2,3 mM
(evitar el contacto con la piel)
REF DCE026-0
6. Etanodiol (1 frasco, 1 mL)
(Nocivo en caso de ingestión)
REF DCE027-0
7. Solución de parada (1 frasco, 7 mL)
Tampón Tris
REF DCE028-0
8. Controles con distintos niveles de solubilización
(2 frascos, 0,6 mL)
Control bajo
REF DCE045/4001-0
Control alto
REF DCE045/4002-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (filtro a 420 nm o 405 nm).

Incubador 37°C

Centrífuga (10000 - 13500 xg "RCF")

Nota

El calibrador de referencia y los controles son sintéticos; garantizan una mayor reproducibilidad y una mayor estabilidad que los de origen humano.

Todos los reactivos deben conservarse a 2-8°C protegidos de la luz y usarse antes de la fecha

indicada en el envase externo. Esperar hasta que los reactivos se encuentren a temperatura ambiente antes del uso.

Respetar la misma secuencia en la distribución de los reactivos. Usar solo muestras séricas (evitar el uso de muestras plasmáticas)

Las muestras humanas se mantienen estables un mes si se conservan a -20°C (seis meses si se conservan a -80°C)

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Materiales de origen animal utilizados para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, aun así estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno ONPG contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- El etanodiol es nocivo si se ingiere; consultar a un médico.
- Evite la exposición de los reactivos ONPG a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de $2-8^{\circ}\text{C}$ en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$) y mezclar cuidadosamente.

- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato ONPG se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato ONPG como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación del inmunocomplejo

Usar el reactivo sin diluir.

Antes del uso, agitar cuidadosamente el inmunocomplejo precipitado con un vórtex.

Estable 3 meses a $2-8^{\circ}\text{C}$.

6.2. Preparación del sustrato ONPG

Añadir 10 mL de agua destilada. Una vez realizada la disolución, añadir 0,5 mL de etanodiol. Estable 2 meses a $2-8^{\circ}\text{C}$.

Importante: para una mejor repetibilidad (interensayo), se recomienda esperar hasta que el sustrato se encuentre a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$) antes del uso (evitar la dispensación del reactivo recién sacado del frigorífico).

6.3. Procedimiento

Paso 1 en tubos Eppendorf

Dispensar las muestras séricas, el control no solubilizante y el calibrador de referencia en una probeta Eppendorf:

	Calibrador de referencia	Muestra o controles	Control no solubilizante
Tampón de incubación	100 µL	100 µL	150 µL
Calibrador de referencia	50 µL	/	/
Muestra o controles	/	50 µL	/
Inmunocomplejo	50 µL	50 µL	50 µL

Vortex e invertir varias veces; garantizar que la solución esté bien mezclado. Mezclar, incubar 2 horas a 37 °C
Centrifugar a 10000-13500 xg "RCF" durante 15 minutos.
Transferir con cuidado, evitando tocar el precipitado, 50 µL del sobrenadante de cada Eppendorf en el pocillo de la microplaca
Importante:

- evitar la resuspensión del precipitado (el precipitado es a menudo poco visible, pero es en la parte inferior del tubo; Por lo tanto, no toque el fondo del tubo con la punta)
- no agitar el centrifugado
- tomar el sobrenadante con cuidado para evitar turbulencias que podrían causar la resuspensión del precipitado

(el precipitado se compone de inmunocomplejo no solubilizado con alta actividad enzimática (β-galactosidasa); la presencia de una pequeña cantidad de precipitado en el sobrenadante puede causar falsos positivos y valores alterados de los controles).

Paso 2 en la microplaca

	Blanco	Calibrador de referencia	Muestra o controles	Control no solubilizante
Tampón de incubación	50 µL	/	/	/
Sobrenadante	/	50 µL	50 µL	50 µL
Substrato ONPG	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

Incubar 15 minutos a 37 °C protegida de la luz.

Solución de parada	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
--------------------	-------	-------	-------	-------

Agitar la microplaca con cuidado.
Leer la absorbancia frente al blanco a 420 (o 405) nm.

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de CH50 para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites

de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

8.1. Interpretación de los resultados

El resultado mostrado por el kit Dia.Metra CH50 no es un resultado de diagnóstico por sí mismo.

Este resultado debe interpretarse junto con otros ensayos y debe evaluarse el cuadro clínico del paciente.

El kit ensayo de CH50 de Dia.Metra proporciona una evaluación de la actividad funcional del complemento total. Este ensayo puede determinar niveles anormales del complemento pero no puede identificar el complemento o los complementos anormales.

El método tradicional para la determinación de la actividad funcional del complemento es el método de hemólisis total. Este método Dia.Metra CH 50 aprovecha la capacidad del complemento de solubilizar los inmunocomplejos y puede correlacionarse totalmente con los demás métodos comerciales.

Con esta reacción se mide la activación de los componentes del complemento tanto de la vía clásica como de la terminal. La actividad total del complemento suele ser anormal si alguno de los componentes es deficitario. La evaluación del CH50 es útil para la detección genética de carencias del sistema del complemento y para el seguimiento de la progresión de la patología en pacientes con enfermedades de los inmunocomplejos.

9. RESULTADOS

9.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada control, del calibrador de referencia y de cada muestra.

9.2. Cálculo de los resultados

Los resultados pueden expresarse como:

- Valor CH50
- % del calibrador de referencia

El valor (CH50) del calibrador de referencia varía dependiendo del lote; el valor exacto se indica en la etiqueta.

Determinar los resultados usando la siguiente fórmula:

- $\text{DO(muestra)} / \text{DO(calibrador de referencia)} \times \text{CH50(valor del calibrador de referencia)} = \text{Valor CH50 de la muestra}$
- $\text{DO(muestra)} / \text{DO(calibrador de referencia)} \times \text{CH}(\% \text{ del calibrador de referencia}) = \% \text{ del calibrador de referencia}$

Ejemplo:

Valor CH50 del frasco calibrador de referencia = 100

% CH50 del frasco calibrador de referencia = 50

Absorbancia del calibrador de referencia = 0,350

Absorbancia de la muestra = 1,108

a. Valor del CH50 de la muestra = $1,108/0,350 \times 100$
= 316

b. % de referencia de la muestra = $1,108/0,350 \times 50$
= 158%

Ed. 09/2018

DCM040-11

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail:info@diametra.com

10. VALORES DE REFERENCIA

% referencia	Valor CH50	Interpretación
0 – 50	0 – 100	Ausente o bajo
51 – 150	101 – 300	Normal
> 151	> 301	Alto

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

11. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

11.1. Correlación

Se han comprobado 22 muestras procedentes de donantes sanos con el kit CH50 Dia.Metra y un kit similar disponible en el mercado. Los resultados se han procesado mediante el análisis de las curvas ROC en dos niveles (bajo y normal), de lo que resulta:

Sensibilidad	100%
Especificidad	94,4%
Acuerdo global	95,5%

12. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

- Miller G.W , Nussenzweig V.
PNAS, 72, 418 – 1975.
- Takahaschi M., Takahaschi S., Brade U.,
Nussenzweig V. J. Clin. Invest. 62, 349 – 1978.
- Migliorini P, et al. J. of Immunological Methods, 77
119-130 (1985)

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico In vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
	DE Achtung, Begleitdokumente ES Precaución, consulte los documentos adjuntos FR Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement GB Caution, consult accompanying documents IT Attenzione, consultare la documentazione allegata PT Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso	LOT	DE Chargenbezeichnung ES Código de lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Código do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests GB Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Limitación de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação	REF	DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo
	DE Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen ES Mantener alejado de la luz solar FR Tenir à l'écart de la lumière du soleil GB Keep away from sunlight IT Tenere lontano dalla luce solare PT Mantenha longe da luz solar		

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs